

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FEINSTRUKTUR UND  
FUNKTION DES ANALORGANS NORMALER UND  
LETALER (1(3)TR) LARVEN VON *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde  
vorgelegt der  
Philosophischen Fakultät II  
der  
Universität Zürich

von  
Christian Brugger  
(Gossau ZH)

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. P. S. CHEN  
Zürich, 1973

PERGAMON PRESS  
OXFORD    LONDON    NEW YORK    PARIS  
1974



# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FEINSTRUKTUR UND FUNKTION DES ANALORGANS NORMALER UND LETALER (*l(3)tr*) LARVEN VON *DROSOPHILA* *MELANOGASTER*

CHRISTIAN BRUGGER

Zoologisch-Vergl. Anatomisches Institut der Universität Zürich, Switzerland

(Received 15 May 1973; revised 11 June 1973)

**Abstract**—The anal organ of larvae of the wild type and the mutant '*lethal-translucida*' (*l(3)tr*,  $3-20 \pm 0.8$ ) of *Drosophila melanogaster* was studied by electron microscopy. By means of cryoscopy and microtitration the total osmotic concentration and the chloride content of the haemolymph were also determined. In addition, the effects of hypotonic and hypertonic solutions on the anal organs and the haemolymph concentration have been analysed in detail. We were especially interested in the functional significance and a possible disturbance of these anal organs in the lethal mutant.

On the basis of the following characters the anal organ appears as a typical absorption organ: (a) The cuticle is distinctly thinner than that of the remaining body parts and has an enlarged surface by forming numerous porous infoldings. (b) On the cuticular surface the plasma membrane of the single-layered epidermal cells forms a large number of folds oriented parallel to each other, resulting in a further increase of the absorption surface. (c) An extensive network of microtubules and a dense population of mitochondria, vacuoles, and vesicles in the cytoplasm suggest that an active transport process takes place in this organ.

After 1 hr in a strong hypotonic solution (distilled water) the plasma membrane folds of both  $+/+$  and *l(3)tr* larvae increase and penetrate deeper into the epidermal cell. The mitochondria also increase in number and are located between the apical folds. Conversely, in a hypertonic solution (1.42–11.96% NaCl) the plasma membrane folds become shorter and fewer in number. The mitochondrial density decreases. With increasing salinity and duration various unidentified bodies, degenerated mitochondria, and vesicles appear, indicating the beginning of autolysis.

The osmotic concentration of 4-day-old  $+/+$  larvae is found to be 1.02% NaCl, whereas that of *l(3)tr* larvae of a corresponding physiological age (5 days old) amounts to only 0.65% NaCl. Both genotypes are able to regulate the osmotic concentration in a hypotonic solution; the upper limit of salt concentration of the surrounding medium for a successful regulation is 5 per cent.

The chloride concentration of  $+/+$  larvae aged 4 days is found to be 0.19% NaCl, and that of *l(3)tr* larvae of a corresponding physiological age 0.14% NaCl. In a hypotonic solution both genotypes are capable of regulating the chloride concentration. However, this fails in a hypertonic medium with a concentration higher than 1% NaCl. When the anal organs are blocked by  $\text{AgNO}_3$  impregnation, the regulatory ability breaks down completely. No

distinct difference in the fine structure as well as in the regulatory achievement of the anal organs between the wild type and the *l(3)tr* mutant could be detected. It seems that the mutational effect does not lie primarily in a defect of the water balance.

### EINLEITUNG

DAS ANALORGAN von *Drosophila melanogaster* wurde 1950 erstmals durch GLOOR und CHEN beschrieben. Dieses Organ besteht aus zwei symmetrischen, im hintersten, ventrolateralen Körperabschnitt liegenden Platten, die den After umgeben. Durch ein erhöhtes Absorptionsvermögen des Analorgans für Silberionen kommt nach deren Reduktion das Organ färberisch zur Darstellung. Gloor und Chen kommen zu der Vermutung, dass das Analorgan fähig ist, aus dem umgebenden, wässrigen Medium Natrium- und Chloridionen aufzunehmen.

GLOOR und CHEN (1950) sowie QUINTART (1960) fanden nach histologischen Untersuchungen im Bereich des Analorgans eine drei- bis viermal dünnere Cuticula und auffallend grosse, breite Epidermiszellen. QUINTART (1960) glaubt 'Leydig'sche Kanäle' gesehen zu haben, welche die Endocuticula durchziehen. Ferner stellte WHEELER (1947) nach Verabreichung von radioaktivem Iod an *Drosophila* Larven eine besonders hohe Konzentration des Iods in der Cuticula des Analorgans fest. Es gelang WADDINGTON (1959), *Drosophila*-Larven auf einem Medium aufzuziehen, das bis zu 7% Kochsalz enthielt. Er stellte bei den angepassten Larven weiter ausgebreitete Analorgane fest. CROGHAN und LOCKWOOD (1960) folgerten daraus, dass diesem Analorgan eine Ausscheidungsfunktion im hypertonen Medium zukomme. YALVAC (1963, 1966) beschrieb die Analorgane von 20 *Drosophila*-Arten. Er betonte die Verschiedenartigkeit der Form dieser Analorgane und schlug vor, sie als taxonomisches Hilfsmittel zu verwenden.

Osmoregulatorische Organe anderer Insektenlarven, die in bezug auf die Fähigkeit der Ionenabsorption (insbesondere der Silberionenabsorption) den Analorganen von *Drosophila* vergleichbar scheinen, sind die Analpapillen der Mückenlarven (vergl. WIGGLESWORTH, 1933a, b, 1938). Neuerdings wurden diese Organe von COPELAND (1964) sowie SOHAL und COPELAND (1966) mit dem Transmissions-elektronenmikroskop genauer untersucht. In diesen erkannten sie eine charakteristisch gefaltete, apikale Plasmamembran, welche die Zelle gegen die Cuticula abgrenzt und gehäuft auftretende Mitochondrien, die auf einen aktiven Transportmechanismus hindeuten. Dass gerade die erwähnten, für diese Zellen typischen Strukturen für die Osmoregulation verantwortlich zu sein scheinen, geht aus zwei Tatsachen hervor: (1) Durch eine Veränderung der Elektrolytenzusammensetzung des äusseren Mediums liessen sich die Häufigkeit der Mitochondrien, sowie der Grad der Plasmamembran-Faltung variieren. (2) Der elektronenmikroskopische Aufbau dieser Zellen lässt sich mit demjenigen typischer Absorptions-, Resorptions- oder Sekretionsorgane vergleichen.

Es gilt mit dieser Arbeit zu untersuchen, ob die Analorgane von *D. melanogaster* tatsächlich im Dienste der Osmoregulation stehen. Zudem interessiert in

diesem Zusammenhang die Frage, ob bei der Mutante 'letal-translucida' (*l(3)tr*,  $3-20 \pm 0,8$ ) gerade diese osmoregulatorische Funktion gestört ist. Die homozygoten Larven dieser Letalmutante zeichnen sich durch eine übermässige Akkumulation von Haemolymph aus (vergl. HADORN, 1961; CHEN, 1971). Dagegen ist zum Zeitpunkt der Verpuppung der Eiweissgehalt der Haemolymph um das Siebenfache reduziert. Es wäre möglich, dass die Mutationsauswirkung primär den Wasserhaushalt der Larve betrifft. Die Akkumulation von Aminosäuren käme dann einem sekundären Regulationsvorgang gleich, durch den eine drohende Hypotonie verhindert werden könnte.

Nach Abschluss unserer Untersuchung haben wir von der elektronenmikroskopischen Arbeit von EICHELBERG *et al.* (1972) Kenntnis bekommen. Wie unten noch beschrieben wird, bestätigten unsere Ergebnisse im wesentlichen diejenigen dieser Autoren.

## MATERIAL UND METHODEN

### *Versuchsmaterial und Zuchtbedingungen*

Larven von *Drosophila melanogaster* des Wildtyps aus dem Stamm Sevelen und letale *l(3)tr*-Homozygote aus der Kreuzung balancierter Stämme [*l(3)tr Ubx/TM<sub>1</sub>, Mé ri sbd<sup>1</sup>*]  $\times$  [*l(3)tr Sb/In(3L)P+(3R)P 18, Mé Ubx e<sup>4</sup>*] dienten als Versuchsmaterial. Die +/+ -Larven aus einstündigen und die Letallarven aus vierstündigen Gelegen wuchsen auf Standardfutter (Agar-Zucker-Mais-Hefe) bei 25°C auf. Bei vergleichenden Untersuchungen zwischen den beiden Genotypen wurden stets Larven gleichen physiologischen Alters verwendet, da die *l(3)tr*-Larven im Vergleich mit dem Wildtyp einen Tag länger bis zum Puppenstadium benötigen.

### *Methoden*

*Transmissionselektronenmikroskopie.* Normale und letale Larven im Alter von 4 bzw. 5 Tagen wurden sauber gewaschen und für 1 Stunde in einer hypotonischen (destilliertes Wasser) oder hypertonischen Lösung (1,5 oder 5,85% NaCl) gehalten. Durch Zusatz von Neutralrot konnten achgewiesen werden, dass die Larven während ihrem Aufenthalt in der Lösung keine Flüssigkeit aufnehmen. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrollen. In einer weiteren Versuchsserie wurden die Larven mit Silbernitrat imprägniert (vergl. unten).

Mit einer Mikroschere wurde den Tieren ohne Narkose unter dem Binokular in einem Tropfen Fixierlösung der hinterste Teil des Abdomens abgeschnitten. Die Fixierung der Gewebestücke geschah in einem Acrolein/Glutaraldehyd-Gemisch im Cacodylatpuffer, der durch eine 10% Saccharoselösung osmotisch balanciert war. Die Nachfixierung erfolgte in einer 1% Osmiumtetroxidlösung. Die Gewebestücke wurden in Araldit eingebettet. Die Schnittkontrastierung geschah in einer in Alkohol gesättigten Uranylacetatlösung sowie einer Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963).

*Oberflächenrasterelektronenmikroskopie.* Ganze Larven wurden nach einem einstündigen Aufenthalt in einer hypotonischen, resp. hypertonen Lösung oder direkt ohne weitere Behandlung in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) eingefroren und anschliessend lyophilisiert. Nach Bedampfung der Larven mit einer Goldschicht geschah die Betrachtung der Präparate in einem Oberflächenrasterelektronenmikroskop.

*Lichtmikroskopie.* Die Larven wurden in Bouinlösung fixiert und in Paraffin bei  $60^{\circ}\text{C}$  eingebettet. Die Färbung der  $7\ \mu$  dicken Schnitte erfolgte mit Haemalaun-Eosin.

*Bestimmung der osmotischen Konzentration der Haemolymphe.* Die Larven wurden gewaschen, getrocknet, narkotisiert und mit zwei feinen Nadeln eröffnet. Die ausfliessende Haemolymphe wurde sofort mit einem Kapillarrohr (3 cm lang, 1 mm Durchmesser) aufgesaugt und über Trockeneis eingefroren. Die Bestimmung der osmotischen Konzentration der gesammelten Haemolymphe erfolgte nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung. Es wurde dabei eine leicht abgeänderte Methode von SMITH und WORKSHOP (1957) übernommen, die auf den Angaben von RAMSAY (1949) basiert. Die Messungen werden in Werten einer äquivalenten NaCl-Konzentration ausgedrückt. Die statistische Sicherung aller Werte erfolgte mit dem Student-*t*-Test.

*Bestimmung des Chloridionengehalts der Haemolymphe.* Die Chloridionenbestimmung wurde durch eine von WIGGLESWORTH (1937) beschriebene Mikrotitration vorgenommen. Die Messungen wurden ebenfalls in Werten einer äquivalenten NaCl-Konzentration ausgedrückt.

*Imprägnierung des Analorgans mit Silbernitrat.* Die gereinigten Larven wurden für fünf Minuten in einer 0,2% Silbernitratlösung gehalten. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte eine vierzigminütige Belichtung (60 W).

## RESULTATE

### *Elektronenmikroskopie*

Für die äussere Morphologie wurden hauptsächlich die Methoden der Oberflächenrasterelektronenmikroskopie und für die Untersuchungen der Histologie und Feinstruktur auch diejenigen der Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie angewendet. In bezug auf ihren Aufbau unterscheiden sich die Analorgane von  $+/+ -$  und  $l(3)tr$ -Larven nicht. Die folgenden Beobachtungen gelten somit für beide Genotypen.

### *Äussere Morphologie*

Abb. 1 zeigt die zwei ventrolateralen, den Anus umschliessenden, plattenförmigen Analorgane deutlich. Sie sind gegen den übrigen Körper klar abgegrenzt. Die Platten erscheinen randständig leicht angewölbt und umschliessen eine tiefe, mittel ständige Furche.

Nach einem Aufenthalt der Larven in einer stark hypotonischen Lösung (destilliertes Wasser) erscheinen die Analorgane extrem nach aussen gewölbt (Abb. 2). Werden hingegen die Larven für 1 Stunde in einer hypertonen

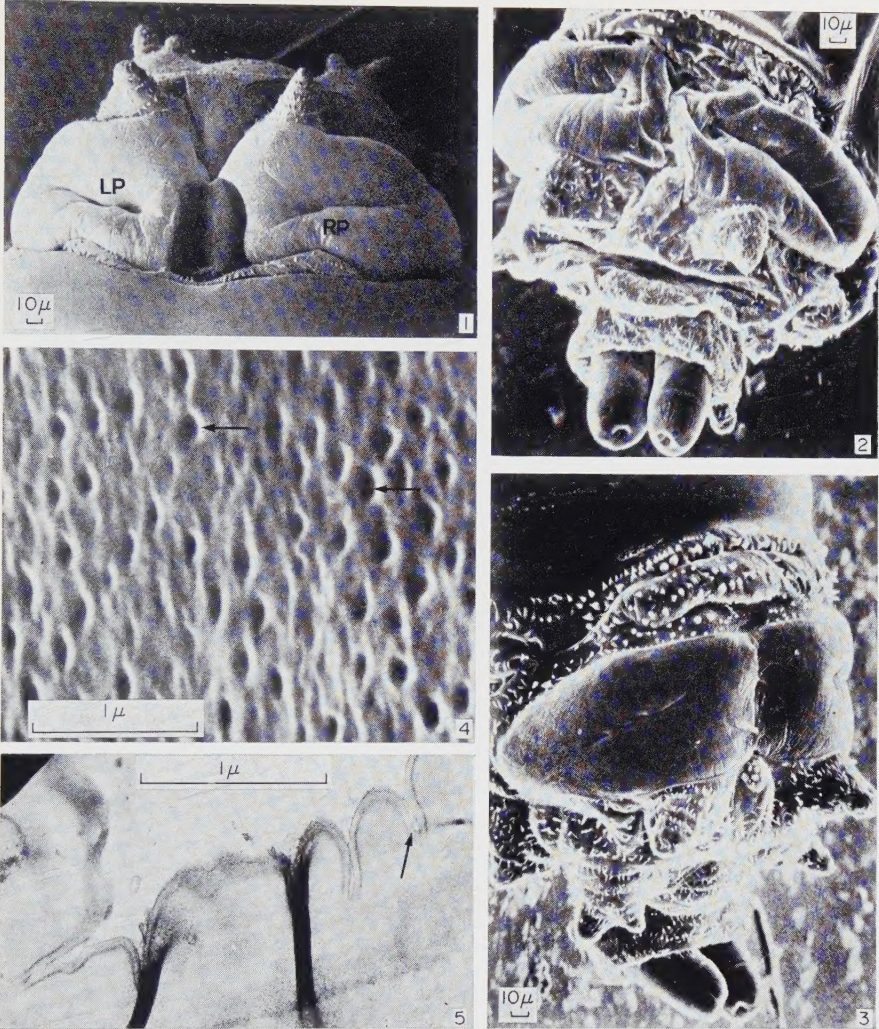


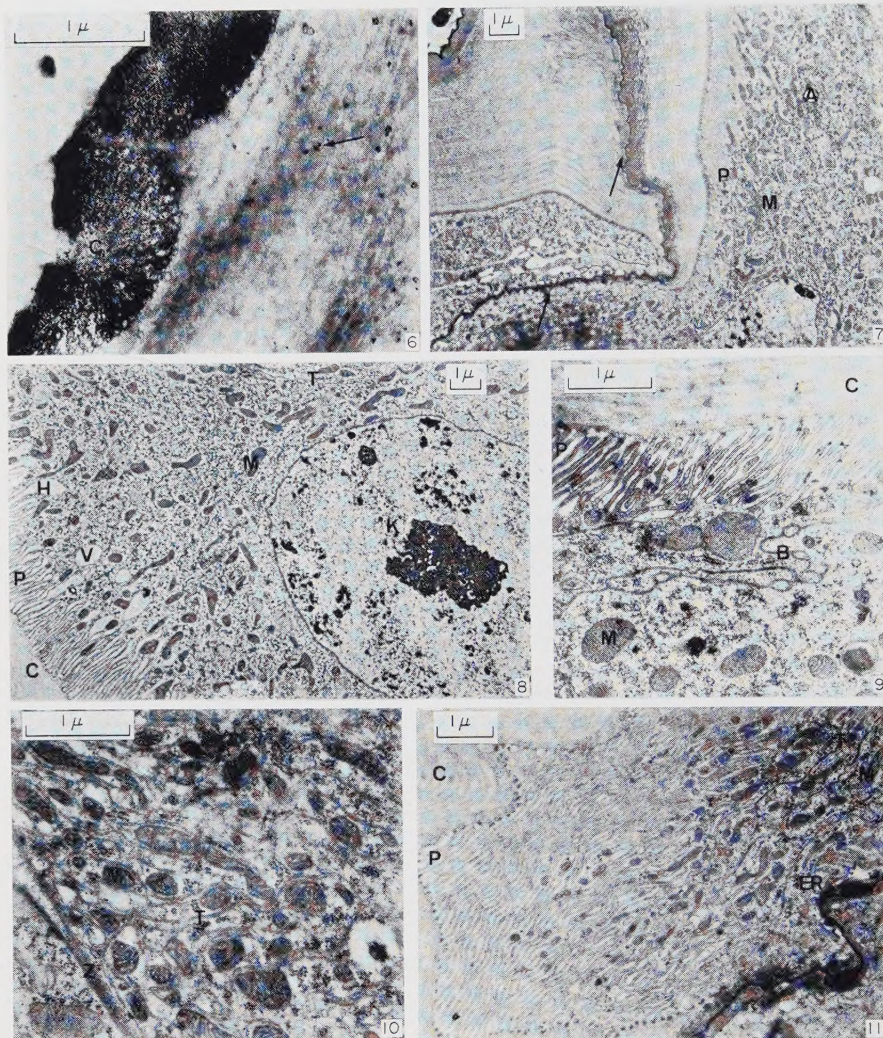
ABB. 1. *l(3)tr/l(3)tr*, ohne Behandlung. Das Analorgan von *D. melanogaster* besteht aus zwei ventrolateral liegenden, den Anus umschliessenden, symmetrischen Platten. (LP = Linke Platte, RP = Rechte Platte, A = Anus.)

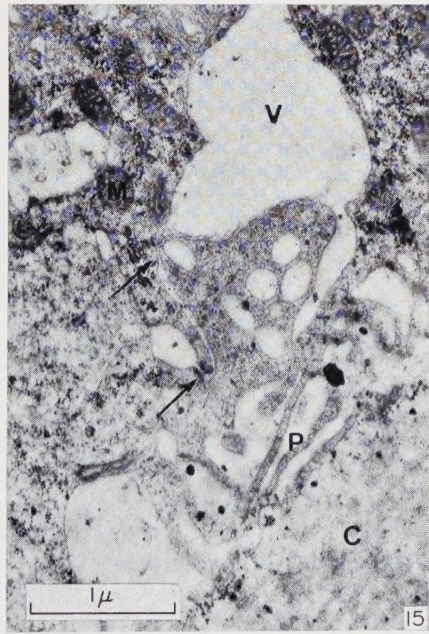
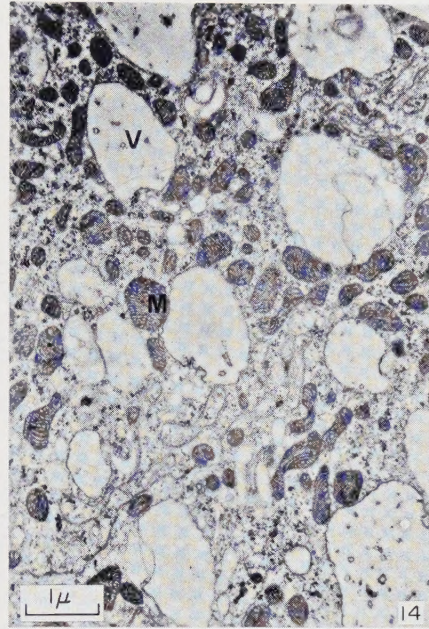
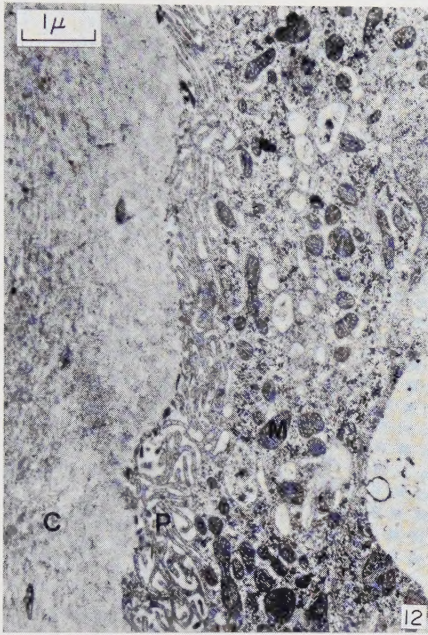
ABB. 2. *+/+*, hypotonisches Medium. Nach einem einstündigen Aufenthalt der Larven in einer stark hypotonischen Lösung präsentieren sich die zwei plattenförmigen Analorgane extrem nach aussen gewölbt.

ABB. 3. *+/+*, hypertonisches Medium (5,85% NaCl). Nach einem einstündigen Aufenthalt der Larven in einer hypertonischen Lösung erscheinen die zwei Analorgane deutlich abgeflacht.

ABB. 4. *+/+*, ohne Behandlung. Die Oberfläche des Analorgans ist mit zahlreichen Poren (↗) durchsetzt.

ABB. 5. *+/+*, ohne Behandlung. Die im Oberflächenrasterelektronenmikroskop entdeckten 'Poren' (ABB. 4) entstehen lediglich durch die Einstülpung der äussersten Cuticulaschichten (↗).







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41507208\\_0054](https://archive.org/details/IA41507208_0054)

Lösung gehalten, so flachen die Analorgane merklich ab. Die randständige Aufwölbung verschwindet, die mittelständige Furche verschliesst sich fast vollständig (Abb. 3).

Die Oberfläche des Analorgans ist—im Gegensatz zu der übrigen Körperoberfläche—mit zahlreichen Poren durchsetzt (Abb. 4). Diese entsprechen in ihrer Tiefe lediglich der Dicke der Epi- und Exocuticula (Abb. 5). Durch die Endocuticula verlaufende Kanäle wurden nicht beobachtet.

ABB. 6. +/+, ohne Behandlung. Nach einer Imprägnierungsbehandlung des Analorgans mit Silbernitrat kommt es zur Anreicherung der Silberkörner in der Exocuticula (C). Einzelne Silberkörner wandern aber trotzdem durch die Endocuticula (↗).

ABB. 7. +/+, ohne Behandlung. Das Analorgan erscheint deutlich gegen den übrigen Körper abgegrenzt (↗). Der zum Analorgan gehörende Epidermisteil (A, rechte Bildseite) zeigt die für dieses Organ charakteristische Faltung der Plasmamembran (P) und Anhäufung von Mitochondrien (M).

ABB. 8. +/+, ohne Behandlung. Man erkennt die dicht stehenden, an die Cuticula (C) grenzenden Plasmamembran-Faltungen (P) und die sich zwischen den einzelnen Falten bildenden Hohlräume (H). Sehr häufig erscheinen Mitochondrien (M), die oft mit den Vakuolen (V) in engem Kontakt stehen. Mikrotubuli (T) durchziehen das Cytoplasma. Die Zellkerne (K) sind gross und oval.

ABB. 9. +/+, ohne Behandlung. Charakteristisch sind Zellmembranen mit 'vesikelähnlichen Dehnungszonen' (B). (C = Cuticula, M = Mitochondrien, P = Plasmamembran-Faltungen.)

ABB. 10. +/+, ohne Behandlung. Kleine Kanälchen (T) erscheinen im Cytoplasma der Epidermiszellen—insbesondere im Bereich der distalen Zellmembran (Z)—sehr häufig. Oft werden sie von Mitochondrien (M) begleitet.

ABB. 11. *l(3)tr/l(3)tr*, hypotonisches Medium. Die der Cuticula (C) anliegenden Plasmamembran-Falten (P) stehen dichter, erscheinen senkrecht zur Cuticula und dringen etwas tiefer ins Cytoplasma vor. Mitochondrien (M) erkennt man sehr häufig; oft dringen sie in die Falten der Plasmamembran vor. Kleine Kanälchen (T) und Endoplasmatisches Retikulum (ER) sind häufig.

ABB. 12. *l(3)tr/l(3)tr*, hypertonisches Medium (1,5% NaCl). Die Plasmamembran-Falten (P) erscheinen kurz und wirr angeordnet. Die weniger zahlreichen Mitochondrien (M) dringen nie in die Plasmamembran-Faltungen vor (C = Cuticula).

ABB. 13. *l(3)tr/l(3)tr*, hypertonisches Medium (1,5% NaCl). Neben zahlreichen Vakuolen (V) erscheinen im Cytoplasma vakuolisierte Mitochondrien (M). Ribosomen (R) und kleine Kanälchen (T) sind häufig.

ABB. 14. *l(3)tr/l(3)tr*, hypertonisches Medium (1,5% NaCl). Man erkennt zahlreiche unregelmässig geformte Vakuolen (V), in denen sich oft kleinste Vesikel befinden. Vakuolen und Mitochondrien (M) stehen vielfach in enger Beziehung zueinander.

ABB. 15. *l(3)tr/l(3)tr*, hypertonisches Medium (1,5% NaCl). Man erkennt oft, dass die Vakuolen (V) durch Kanäle (↗) miteinander in Verbindung treten. (C = Cuticula, P = Plasmamembran-Falten, M = Mitochondrien.)

Nach der Imprägnation mit Silbernitrat lagern sich die meisten reduzierten Silberkörner in der Exocuticula an (Abb. 6). Zahlreiche, wenn auch bedeutend weniger Silberionen wandern durch die Endocuticula in Richtung Epidermis.

### *Feinstruktur*

Es lassen sich an der Cuticula des Analorgans die üblichen drei Schichten unterscheiden: (1) eine sehr dünne, äussere Epicuticula, (2) eine schmale, dunkel kontrastierte Exocuticula und (3) eine breite, nicht kontrastierte Endocuticula mit lamellärem Aufbau. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Cuticula im Bereich des Analorgans, verglichen mit der übrigen Cuticula des Körpers, bedeutend dünner ist. Die Cuticulaschichten des Analorgans und des übrigen Körperskeletts erscheinen deutlich gegeneinander abgegrenzt. Die vollständige Trennung kommt durch eine tiefe Einfaltung der Epicuticulaschicht zustande (Abb. 7).

Unsere bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Feinstruktur der Epidermiszellen sich je nach der Salinität des Aussenmediums regulatorisch verändert.

*Normalzustand (ohne Behandlung).* Die äussere, an die Cuticula grenzende Zelloberfläche der breiten Epidermiszellen erscheint stark gefaltet ('Plasmamembran-Faltungen'); die innere, distale Membran verläuft beinahe geradlinig. Zwischen den schmalen, parallel verlaufenden Plasmamembran-Faltungen bilden sich kleinere bis grössere Hohlräume (Abb. 8). Die einzelnen Zellen der einzelligen Epidermisschicht sind durch 'septate desmosome' und Desmosomen des 'macula adhaerens Typ' gegeneinander abgegrenzt. Hier und da wird die Zellmembran von 'vesikelähnlichen Dehnungszonen' (Abb. 9) unterbrochen. Die Zellen enthalten grosse, ovale Zellkerne (Abb. 8).

Im Cytoplasma liegen zahlreiche Mitochondrien, die nur selten in den Faltungen der apikalen Zellmembran zu finden sind, aber oft basal dieser Plasmamembran-Faltungen angereichert erscheinen (Abb. 8). Ihre Form variiert beträchtlich; die Cristae sind vielfach irregulär angeordnet. Die Mitochondrien stehen oft in engem Kontakt mit den Mikrotubuli und Vakuolen (Abb. 8, 10). Ribosomen sind häufig festzustellen; selten findet man Endoplasmatisches Retikulum und Golgi Zonen. Häufig treten Vakuolen auf. Besonders gehäuft beobachtet man sie im Bereich der apikalen Plasmamembran-Faltungen. Sie scheinen sich dort abzuschnüren (Abb. 8). Feine Mikrotubuli durchziehen das Cytoplasma der Epidermiszellen und konzentrieren sich recht häufig an der distalen Membran (Abb. 10). Tracheen und Tracheolen erscheinen vor allem im basalen Bereich sehr häufig. Selten findet man Glykogeneinschlüsse.

*Nach Behandlung in einer hypotonischen Lösung.* Bei einer vergleichenden Betrachtung von  $+/+$ - und  $l(3)tr$ -Larven fällt als einziger Unterschied auf, dass in der Epidermisschicht der  $+/+$ -Larven im distalen Bereich öfters zahlreiche kleine, runde Vakuolen vorkommen, die sich gegen das Innere des Körpers zu entleeren scheinen.

Im Analorgan haben sich durch den Aufenthalt im hypotonischen Medium gewissen Strukturen verändert. Die apikalen Plasmamembran-Faltungen haben

sich bedeutend vermehrt und stehen daher dichter. Die einzelnen Falten verlaufen geradliniger, stehen meist senkrecht zur Cuticula und dringen tiefer ins Zellplasma vor (Abb. 11). Die Mitochondrien kommen zahlreicher vor als in den unbehandelten Larven. Oft dringen sie in die Faltungen der Plasmamembran vor und immer findet man sie extrem gehäuft distal der Plasmamembran-Faltungen. Endoplasmatisches Retikulum erkennt man recht häufig. Zahlreiche Mikrotubuli durchziehen das Zellplasma; einzelne münden direkt zu den Hohlräumen zwischen den Plasmamembran-Faltungen. Die häufig vorkommenden Vakuolen erscheinen ebenfalls oft von Mitochondrien begleitet.

*Nach Behandlung in einer hypertonen Lösung.*  $+/+ -$  und  $l(3)tr$ -Larven verändern sich nach einem Aufenthalt in einer hypertonen Lösung in gleicher Weise. Die apikale Plasmamembran ist schwächer gefaltet. Die wenigen, wirt angeordneten Plasmafortsätze, zwischen denen sich grosse Hohlräume befinden, sind nur noch kurz (Abb. 12). Mitochondrien sind nach einem Aufenthalt in einer 1,5% Kochsalzlösung noch recht häufig; nach einem Aufenthalt in einer 5,85% Kochsalzlösung fehlen sie hingegen beinahe. Nie liegen die Mitochondrien in den Faltungen der Plasmamembran. Zahlreiche Mitochondrien der Epidermiszellen und der diesen anliegenden Zellschicht erscheinen vakuolisiert (Abb. 13). Unregelmässig geformte Vakuolen mit gut erkennbaren, oft vesikelähnlichen Einschlüssen kommen in allen Zellen vor (Abb. 14). Zahlreiche dieser Vakuolen scheinen miteinander zu verschmelzen; kleinere Vakuolen werden von grösseren aufgenommen. Mehrere Vakuolen sind hie und da deutlich durch Kanäle miteinander verbunden (Abb. 15). Häufig sind Mikrotubuli zu beobachten (Abb. 14). Ribosomen und Endoplasmatisches Retikulum erscheinen angereichert; letzteres kommt gehäuft in der Nähe von Kernen und Vakuolen vor. Das Vorkommen von Einschlüssen präsentiert sich mannigfaltig. Häufig erkennt man kleinste, runde Vesikel mit einem Durchmesser von 0,05 bis 0,1  $\mu$ . Sie liegen frei im Cytoplasma und fast in jeder Vakuole (Abb. 14). Nach einem Aufenthalt in einer 5,85% Kochsalzlösung treten diese Vesikel gehäuft auf. Zudem findet man multivesikuläre Körper, undefinierbare 'Dichte-Körper' und lamelläre Körper.

### *Osmoregulatorische Funktion—Osmotische Konzentration*

*Normalzustand (ohne Behandlung).* Die osmotische Konzentration wurde an drei bis sechs Tage alten Larven gemessen. Wie Tabelle 1 zeigt, ist die osmotische Konzentration in  $+/+ -$  Larven bedeutend höher als in den  $l(3)tr$ -Larven des entsprechenden physiologischen Alters. In beiden Genotypen erreicht die osmotische Konzentration bei den dreitägigen Larven das Maximum, um dann mit zunehmendem Alter abzufallen. Lediglich bei den  $+/+ -$  Larven steigt sie kurz vor der Verpuppung (fünftägige Larven) noch einmal zu einem Wert an, der sich statistisch gesehen vom Maximalwert der dreitägigen Larven nicht unterscheiden lässt. Ausser dieser Ausnahme sind alle Werte mit  $P < 0,05$  statistisch gesichert voneinander verschieden.

*Regulationsvermögen in hypo- und hypertonen Lösungen.* Es wird mit vier-tägigen  $+/+$ - und fünftägigen  $l(3)tr$ -Larven gearbeitet, die vor den osmotischen Konzentrationsbestimmungen für 15, 30, 60 oder 120 Min in einer hypotonischen (destilliertes Wasser) oder hypertonen Lösung (2,92%, 5,85%, 11,96% NaCl)

TABELLE 1—OSMOTISCHE GESAMTKONZENTRATION DER HAEMOLYPHE BEI NORMALEN UND LETALEN LARVEN (DIE WERTE SIND IN ÄQUIVALENTER NaCl-KONZENTRATION ANGEZEIGT)

| Genotyp | Alter (Tage) | <i>n</i> | Osmotische Konzentration (% NaCl) | Genotyp  | Alter (Tage) | <i>n</i> | Osmotische Konzentration (% NaCl) |
|---------|--------------|----------|-----------------------------------|----------|--------------|----------|-----------------------------------|
| $+/+$   | 3            | 15       | $1,31 \pm 0,04$                   | $l(3)tr$ | 3            | 7        | $0,78 \pm 0,03$                   |
| $+/+$   | 4            | 27       | $1,02 \pm 0,02$                   | $l(3)tr$ | 4            | 13       | $0,68 \pm 0,02$                   |
| $+/+$   | 5            | 8        | $1,3 \pm 0,05$                    | $l(3)tr$ | 5            | 33       | $0,65 \pm 0,02$                   |
|         |              |          |                                   | $l(3)tr$ | 6            | 7        | $0,61 \pm 0,04$                   |

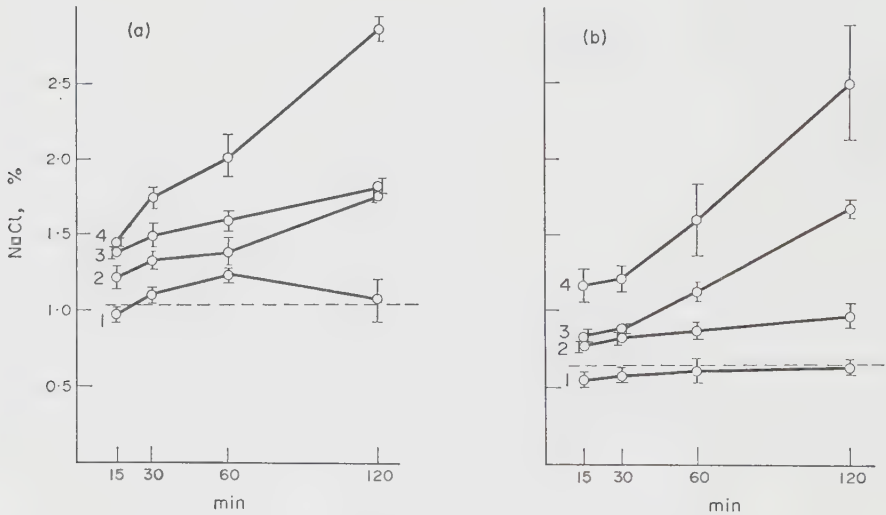


ABB. 16. Bestimmung der osmotischen Konzentration an  $+/+$ - (a) und  $l(3)tr$ -Larven (a) nach 15, 30, 60 oder 120 Min Aufenthalt in einer hypotonischen—(1), resp. verschiedenen hypertonen Lösungen (2: 2,92%; 3: 5,85%; 4: 11,96% NaCl). Die gestrichelten Linien markieren die Kontrollwerte.

gehalten wurden. Wie aus Abb. 16 ersichtlich ist, reagieren Larven beider Genotypen auf die beschriebene Behandlung weitgehend gleich. Nach einem Aufenthalt in einer hypotonischen Lösung weicht die osmotische Haemolymphkonzentration nie mehr als 20% vom Kontrollwert ab. Die  $l(3)tr$ -Larven erreichen den Ausgangswert bereits wieder nach einem 60-minütigen, die  $+/+$ -Larven nach einem 120-minütigen Aufenthalt im destillierten Wasser. Die Larven verfügen demnach in einer hypotonischen Lösung über einen wirkungsvollen

Regulationsmechanismus. Das Verhalten der  $+/+$ -Larven unterscheidet sich dadurch von demjenigen der  $l(3)tr$ -Larven, dass sie ab einem 30-minütigen Aufenthalt im destillierten Wasser zu einer 'Ueberkompensation' befähigt sind.

Ein Aufenthalt in einer der drei hypertonischen Lösungen bewirkt in beiden Larventypen stets einen kontinuierlichen Anstieg der osmotischen Konzentration der Haemolymphe. Eindeutig erfolgreich wird während einem Aufenthalt in einer 2,92% Kochsalzlösung reguliert; der Konzentrationsanstieg nach 120-minütiger Versuchsdauer in den  $+/+$ -Larven mag aber darauf hindeuten, dass diesem Regulationsvermögen zeitlich Grenzen gesetzt sind. Während der ersten Stunde gelingt beiden Larventypen auch in einer 5,85% Kochsalzlösung die Regulation der osmotischen Konzentration recht eindrücklich. Nach zweistündiger Versuchsdauer bricht aber der Regulationsmechanismus, insbesondere bei den  $l(3)tr$ -Larven, zusammen. Während einem Aufenthalt in einer 11,96% Kochsalzlösung versagt der Regulationsmechanismus in beiden Larventypen schon nach 15-minütiger Versuchsdauer.

#### *Regulationsvermögen nach Imprägnierung der Analorgane mit Silbernitrat*

Die Analorgane der viertägigen  $+/+$ - und fünftägigen  $l(3)tr$ -Larven wurden mit Silbernitrat imprägniert. Nach einem Aufenthalt von 15, 30 oder 120 Min Dauer in einer hypotonischen (destilliertes Wasser), resp. hypertonischen Lösung (2,92% oder 5,85% NaCl) wurde die osmotische Konzentration der Haemolymphe gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 17 zusammengestellt.

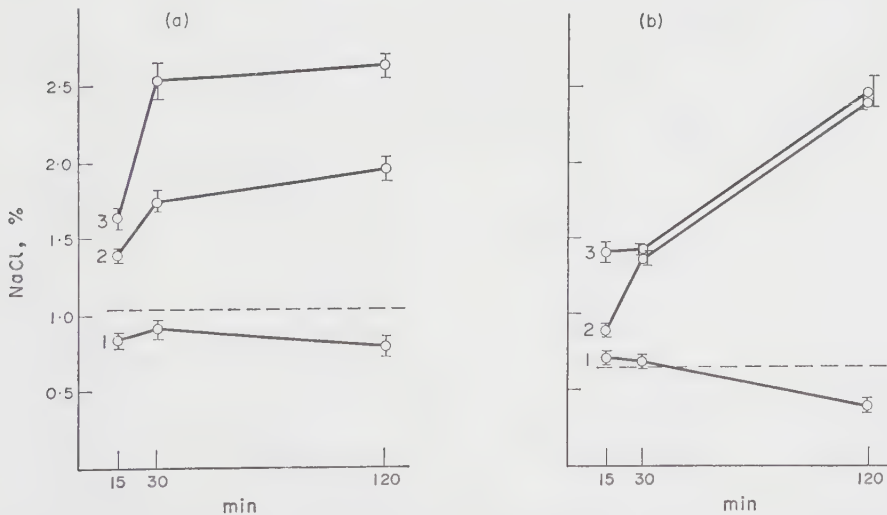


ABB. 17. Bestimmung der osmotischen Konzentration an  $+/+$ - (a) und  $l(3)tr$ -Larven (b) mit blockierten Analorganen nach 15, 30, und 120 Min Aufenthalt in einer hypotonischen—(1), resp. verschiedenen hypertonischen Lösungen (2: 2,92%; 3: 5,85% NaCl). Die gestrichelten Linien markieren die Kontrollwerte.

Beide Genotypen vermögen im hypotonischen Milieu mindestens während der ersten halben Stunde zu regulieren; bei den *l(3)tr*-Larven ist sogar eine Überkompensation festzustellen. In den hypertonischen Lösungen bricht der Regulationsmechanismus in den  $+/+-$  und *l(3)tr*-Larven zusammen und steigt die osmotische Konzentration sofort stark an.

*Osmotische Konzentration der restituierten Haemolymphe bei l(3)tr-Larven.*

Viertägige *l(3)tr*-Larven wurden mit zwei Nadeln angestochen; dabei floss die unter Druck stehende Haemolymphe aus. Rund ein Achtel aller Versuchslarven überlebte den Eingriff; sie restituierten die verloren gegangene Haemolymphe innert 24 Stunden. Einzelne Bestimmungen der osmotischen Konzentration der so restituierten Haemolymphe von insgesamt 24 angestochenen Tieren ergaben einen mittleren Wert von  $0,65 \pm 0,05\%$  NaCl, während derjenige vor dem Anstechen  $0,68 \pm 0,02\%$  NaCl beträgt. Eine statistische Prüfung zeigt, dass die beiden Werte sich nicht signifikant (Student *t*-Test,  $P < 0,02$ ) voneinander unterscheiden.

*Chloridionenkonzentration*

*Ohne Imprägnierung der Analorgane mit Silbernitrat.* Nachdem viertägige  $+/+-$  und fünftägige *l(3)tr*-Larven für 15, 30 oder 60 Min in einer hypotonischen (destilliertes Wasser), resp. hypertonischen Lösung (1,46%, 2,92% oder 5,85% NaCl) gehalten wurden, begann man mit der Bestimmung der Chloridionenkonzentration der Haemolymphe. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Die Resultate zeigen, dass die Chloridionenkonzentration in den

TABELLE 2—VERÄNDERUNGEN DES CHLORIDGEHALTES DER HAEMOLYPHE NORMALER UND LETALER LARVEN NACH BEHANDLUNGEN IN HYPO- UND HYPERTONISCHEN LÖSUNGEN (DIE WERTE SIND IN ÄQUIVALENTER NaCl-KONZENTRATION ANGEZEIGT)

| Medium                 | Behandlungsdauer<br>(Min) | Chloridgehalt (% NaCl) |                      |          |                  |
|------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|----------|------------------|
|                        |                           | <i>n</i>               | <i>l(3)tr/l(3)tr</i> | <i>n</i> | $+/+-$ -Larven   |
| H <sub>2</sub> O dest. | 15                        | 8                      | $0,09 \pm 0,003$     | 5        | $0,15 \pm 0,003$ |
|                        | 30                        | 12                     | $0,11 \pm 0,003$     | 5        | $0,2 \pm 0,006$  |
|                        | 60                        | 5                      | $0,12 \pm 0,007$     | 5        | $0,18 \pm 0,007$ |
| 1,46% NaCl             | 15                        | 5                      | $0,15 \pm 0,008$     | 6        | $0,22 \pm 0,009$ |
|                        | 30                        | 5                      | $0,17 \pm 0,009$     | 6        | $0,31 \pm 0,021$ |
|                        | 60                        | 6                      | $0,19 \pm 0,019$     | 6        | $0,32 \pm 0,052$ |
| 2,92% NaCl             | 15                        | 6                      | $0,18 \pm 0,006$     | 6        | $0,28 \pm 0,014$ |
|                        | 30                        | 8                      | $0,18 \pm 0,013$     | 6        | $0,35 \pm 0,013$ |
|                        | 60                        | 10                     | $0,19 \pm 0,017$     | 6        | $0,37 \pm 0,023$ |
| 5,85% NaCl             | 15                        | 8                      | $0,18 \pm 0,009$     | 4        | $0,36 \pm 0,000$ |
|                        | 30                        | 8                      | $0,2 \pm 0,011$      | 4        | $0,37 \pm 0,028$ |
|                        | 60                        | 8                      | $0,2 \pm 0,007$      | 6        | $0,38 \pm 0,031$ |
| Kontrolle              |                           | 11                     | $0,14 \pm 0,006$     | 11       | $0,19 \pm 0,005$ |

+/-Larven rund 25% höher liegt als in den *l(3)tr*-Larven. Sowohl +/- wie auch *l(3)tr*-Larven verfügen während einem Aufenthalt in einer hypotonischen Lösung über eine Regulationsfähigkeit. Der Chloridionenspiegel der Haemolymph sinkt zwar nach einem 15-minütigen Aufenthalt stark ab, steigt dann aber mit zunehmender Versuchsdauer sukzessive wieder an. Bei den +/-Larven kommt es nach 30 Min sogar zu einer 'Überkompensation'.

Dagegen kann weder bei den +/- noch den *l(3)tr*-Larven in den hypertotonischen Lösungen je ein wirkungsvolles Regulationsvermögen festgestellt werden. Der Chloridionenspiegel steigt stets bereits nach 15-minütiger Versuchsdauer stark an. Je länger die Larven im hypertotonischen Medium gehalten werden, und wie konzentrierter diese hypertotonische Lösung ist, desto deutlicher fällt die Erhöhung der Chloridionenkonzentration aus.

Nach *Imprägnierung der Analorgane mit Silbernitrat*. Die Versuchsanordnung deckt sich mit derjenigen im vorangehenden Abschnitt beschriebenen. Bevor aber die Larven in das hypo-, resp. hypertotonische Medium gesetzt wurden, blockierte man ihnen das Analorgan mit Silbernitrat.

Tabelle 3 fasst alle Messungen zusammen. Es zeigt sich, dass durch das Ausschalten der Analorgane das Regulationsvermögen für Chloridionen zusammenbricht. Sogar in hypotonischen Lösungen fehlt jedigliches Anzeichen einer Regulationsfähigkeit. Die Chloridionenkonzentration, die bereits nach 15 Min um rund 40% absinkt, fällt mit zunehmender Versuchsdauer stetig.

TABELLE 3—VERÄNDERUNGEN DES CHLORIDGEHALTES DER HAEMOLYPHE IM HYPO- UND HYPERTONISCHEN MEDIUM BEI NORMALEN UND LETALEN LARVEN, DEREN ANALORGAN VOR DER BEHANDLUNG MIT SILBERNITRAT BLOCKIERT WURDE (DIE WERTE SIND IN ÄQUIVALENTER NaCl-KONZENTRATION ANGEZEIGT)

| Medium                 | Behandlungsdauer<br>(Min) | Chloridgehalt (% NaCl) |                      |    |              |
|------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|----|--------------|
|                        |                           | n                      | <i>l(3)tr/l(3)tr</i> | n  | +/-Larven    |
| H <sub>2</sub> O dest. | 15                        | 8                      | 0,1 ± 0,002          | 5  | 0,12 ± 0,003 |
|                        | 30                        | 12                     | 0,09 ± 0,002         | 5  | 0,1 ± 0,004  |
|                        | 60                        | 7                      | 0,08 ± 0,001         | 5  | 0,11 ± 0,004 |
| 1,46% NaCl             | 15                        | 6                      | 0,15 ± 0,003         | 7  | 0,32 ± 0,026 |
|                        | 30                        | 5                      | 0,17 ± 0,004         | 5  | 0,35 ± 0,000 |
|                        | 60                        | 6                      | 0,18 ± 0,014         | 6  | 0,36 ± 0,017 |
| 2,92% NaCl             | 15                        | 7                      | 0,17 ± 0,085         | 5  | 0,36 ± 0,000 |
|                        | 30                        | 6                      | 0,19 ± 0,009         | 6  | 0,37 ± 0,023 |
|                        | 60                        | 7                      | 0,19 ± 0,008         | 4  | 0,38 ± 0,013 |
| 5,85% NaCl             | 15                        | 7                      | 0,18 ± 0,007         | 5  | 0,38 ± 0,000 |
|                        | 30                        | 9                      | 0,2 ± 0,007          | 5  | 0,38 ± 0,000 |
|                        | 60                        | 8                      | 0,2 ± 0,006          | 6  | 0,38 ± 0,000 |
| Kontrolle              |                           | 11                     | 0,14 ± 0,006         | 11 | 0,19 ± 0,005 |

+/-Larven zeigen nach einem Aufenthalt in einer 1,45% oder 2,92% Kochsalzlösung einen—verglichen mit den Larven mit intakten Analorganen—bedeutend höheren Chloridionenspiegel. Erst jetzt scheint der Regulationsmechanismus für Chloridionen völlig zusammenzubrechen. Wurden die Tiere hingegen in einer 5,85% Kochsalzlösung gehalten, nimmt die Chloridionenkonzentration um Werte zu, die mit denjenigen aus Larven mit intakten Analorganen weitgehend übereinstimmen. Bei *l(3)tr*-Larven, die in einer hypertonen Lösung gehalten wurden, steigt der Chloridionenspiegel in der für Larven mit intakten Analorganen beschriebenen Weise.

#### DISKUSSION

##### *Vergleich der Feinstruktur der Analorgane bei Drosophila mit anderen osmoregulatorischen Organen bei Insekten*

Nach den Ergebnissen der vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen handelt es sich beim Analorgan von *D. melanogaster* um ein deutlich abgegrenztes, selbständiges Organ. In Übereinstimmung mit den Befunden von EICHELBERG *et al.* (1972) deuten zahlreiche Strukturen des Analorgans auf einen darin stattfindenden, aktiven Stofftransport hin: (1) Die Cuticula ist, verglichen mit dem übrigen Exoskelett, dünner, zeigt zudem eine durch zahlreiche Einstülpungen erreichte Oberflächenvergrößerung und kann von Ionen durchwandert werden. (2) Durch eine vielfache Faltung der cuticulanahen, apikalen Epidermiszelloberfläche wird die Aufnahme- und Abgabe-Fläche für Stoffe erheblich vergrößert. (3) Ein ausgedehntes Netz von Mikrotubuli und zahlreiche Vakuolen machen einen Transport durch die Epidermiszelle möglich. (4) Eine Assoziation dieses ausgedehnten Membransystems mit zahlreichen Mitochondrien deutet darauf hin, dass es sich um einen energiebedürftigen, aktiven Stofftransport handelt.

Auch vergleichende histologische Untersuchungen zeigen zwischen dem Analorgan von *Drosophila* und den Analpapillen von Mückenlarven (SOHAL und COPELAND, 1966) deutliche bauliche Übereinstimmung. Allerdings wurde der von COPELAND (1964) mit 'mitochondrial pump' umschriebene enge Kontakt zwischen zwei Mitochondrien und einem Mikrotubulus im Analorgan von *Drosophila* nur selten beobachtet.

Verschiedene Autoren (TSUBO und BRANDT, 1962; WIGGLESWORTH und SALPETER, 1962; SMITH, 1968) fanden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen in den Malpighischen Gefässen eine gefaltete, apikale Plasmamembran (z.T. 'Basalmembran' genannt), durch welche nachgewiesenermassen ein Transport von Ionen und Wasser aus der Haemolymphe ins Tubuli-Lumen stattfindet. Auch in diesen Arbeiten wird auf gehäuft auftretende Mitochondrien, Mikrotubuli, Vakuolen, Einschlüsse und Zellmembranen mit vesikelähnlichen Dehnungszonen hingewiesen.

Interessant ist ein Vergleich mit den Ionen und Wasser rückresorbierenden Rektaldrüsen des Insekten-Enddarms (GUPTA und BERRIDGE, 1966a, b; BURSELL, 1970). Auch hier kommt es in den grossen Epithelzellen zu einer durch starke

Faltung erreichte Vergrößerung der an die Cuticula grenzenden, absorbierenden Zelloberfläche. Zahlreiche Mitochondrien liegen zerstreut im Cytoplasma der Epidermiszellen und—allerdings selten—in den Plasmamembran-Faltungen. Die Autoren beschrieben zudem grosse, ovale Zellkerne, häufig auftretende Vakuolen, selten erkennbare Glykogeneinschlüsse und Lysosomen. Als Zellbegrenzungen beobachteten sie ebenfalls 'septate desmosome', Desmosomen des 'macula adhaerens Typ' und Membranen mit 'vesikelähnlichen Dehnungszonen'. Die von GUPTA und BERRIDGE (1966a, b) erwähnten 'membrane-limited-sacs' fehlen beim Analorgan von *Drosophila* gänzlich.

### *Osmoregulation im hypotonischen Medium*

Die in der vorliegenden Arbeit bei  $+/+$ -Larven gemessene osmotische Konzentration (1,02% NaCl) und Chloridionenkonzentration (0,19% NaCl) stimmen mit den von ZWICKY (1954) angegebenen Werten (1,1% und 0,22% NaCl) gut überein. Nach GLOOR und CHEN (1950) beträgt der Chloridgehalt dieses Insekts 0,24% NaCl. Wesentlich tiefer liegen die entsprechenden Werte für *l(3)tr*-Larven (0,65% und 0,14% NaCl). In beiden Larventypen darf der niedrige Chloridionengehalt als für Insektenblut typisch angesehen werden (WIGGLESWORTH, 1938).

Nach einem Aufenthalt in einer hypotonischen Lösung kommt es zu einer zusätzlichen Oberflächenvergrößerung im Bereich des Analorgans. Diese äussert sich einerseits in einer Aufwölbung des Analorgans und anderseits in einer Vermehrung und Verlängerung der Plasmamembran-Falten. Ähnliche Beobachtungen machten SOHAL und COPELAND (1966) durch entsprechende Experimente an Analpapillen von Mückenlarven. Nach WIGGLESWORTH (1938) kann diese regulatorische Reaktion des Analorgans als 'funktionelle Hypertrophie' gedeutet werden. Die Anreicherung von Vakuolen in den  $+/+$ -Larven ist wahrscheinlich auf eine vermehrte Wasseraufnahme in die Epidermiszellen durch die vergrösserte Absorptionsoberfläche zurückzuführen.

Die Tatsache, dass im hypotonischen Medium die osmotische Gesamtkonzentration vor der Chloridionenkonzentration reguliert wird, deutet darauf hin, dass zur Regulation nicht nur Ionen aus dem Aussenmedium aufgenommen werden, sondern wahrscheinlich zudem osmotisch wirksame Substanzen im Körper freigesetzt werden. Schon WIGGLESWORTH (1938) stellte fest, dass die Nicht-Chlorid-Fraktion des Insektenblutes den osmotischen Druck, und damit die Schwankungen im Chloridionenspiegel, ausgleichen kann. BEADLE and SHAW (1950) postulierten, dass den freien Aminosäuren eine wichtige osmoregulatorische Funktion zufalle, da diese einen Hauptanteil der Nicht-Chlorid-Fraktion ausmachen. Auch die in  $+/+$ -Larven beobachtete teilweise 'Überkompensation' kann mit der Freisetzung osmotisch wirksamer Substanzen erklärt werden.

Trotz der Blockierung der Analorgane kann die osmotische Gesamtkonzentration im hypotonischen Medium während der ersten halben Stunde reguliert werden. Auch hier vermögen andere osmotisch wirksame Substanzen des Körpers den Chloridionenverlust zu kompensieren. Bei den *l(3)tr*-Larven kommt es trotz

der Blockierung der Analorgane zu einer teilweisen 'Überkompensation'. Vielleicht ist diese Mutante auf Grund ihres überdurchschnittlich hohen Aminosäuregehalts in der Lage, die osmotische Konzentration zu regulieren. Diese Vermutung wird durch die Tatsache erhärtet, dass in *l(3)tr*-Larven, trotz bedeutend schlechterer Regulation des Chloridionenspiegels, die osmotische Gesamtkonzentration stets ebensogut oder sogar besser reguliert wird als in den  $+/+$ -Larven. Folglich müssen die Letallarven über mehr, vom Körper freizusetzende, osmotisch wirksame Substanzen verfügen als die Normalen.

### *Osmoregulation im hypertonen Medium*

Nach einem Aufenthalt in einer hypertonen Lösung kommt es zu einer merklichen Reduktion der Absorptionsfläche der Analorgane. Dies äussert sich in einer Abflachung der Analorgane und einer Verkürzung sowie Reduzierung der Plasmamembran-Falten. Auch die Reduktion der Mitochondrienzahl und jegliches Fehlen der Mitochondrien in den Plasmamembran-Faltungen deuten auf eine Unterbrechung der aktiven Aufnahme von Ionen und deren Weiterbeförderung zur Haemolymph hin.

Die osmotische Konzentration kann durch die Larve bedeutend besser reguliert werden als die Chloridionenkonzentration. In Übereinstimmung mit den Befunden von ZWICKY (1954) wird die osmotische Konzentration sogar in einer 5% Kochsalzlösung noch teilweise reguliert, währenddem das hypertone Medium 1% NaCl nicht übersteigen darf, um noch eine Regulationsfähigkeit in bezug auf die Chloridionenkonzentration erwarten zu können. WIGGLESWORTH (1938) stellte für *Aedes aegypti* eine Chloridionenregulation in Kochsalzlösungen bis 0,75% fest.

Die für die osmotische Gesamtkonzentration festgestellte Regulationsfähigkeit dürfte in erster Linie mit einem gesteigerten Ausscheidungsvermögen (z.B. Malpighische Gefässe) sowie einer gehemmten Rückresorption (z.B. Rektaldrüsen) für Salzionen zusammenhängen. Auch die Analorgane spielen dabei eine aktive Rolle. Daher zeigen die Larven nach der Blockierung dieser Organe einen deutlichen Anstieg der Chloridionen- und der osmotischen Konzentration.

Im Augenblick maximaler osmotischer Belastung übernehmen die Mitochondrien wahrscheinlich eine Träger- und eventuell Transportfunktion für Salzionen und Wasser. Sie erscheinen in der Folge vakuolisiert. Dauert die osmotische Überbelastung zu lange, nimmt der Vakuolisierungsvorgang der Mitochondrien zu, werden die Cristae zerstört und degenerieren die Mitochondrien schlussendlich völlig. Schon CLARK (1957) und ROBINSON (1960) stellten fest, dass Mitochondrien Salzionen aufnehmen und transportieren können. Parallel zu der Vakuolisierung der Mitochondrien erfolgen die ersten Autolyseerscheinungen. Die Mitochondrien zerfallen, unzählige, undefinierbare Körper treten auf und das Regulationsvermögen bricht vollständig zusammen.

Der Umstand, dass in den *l(3)tr*-Larven die Chloridionenkonzentration ganz allgemein bedeutend mässiger und—im Gegensatz zu den  $+/+$ -Larven—

langsamer steigt als die osmotische Gesamtkonzentration nach entsprechender Behandlung, mag folgendermassen gedeutet werden: (1) Das Ausgangsniveau für Chloridionen liegt in den *l(3)tr*-Larven bedeutend tiefer. (2) Die in den *l(3)tr*-Larven enthaltene grosse Flüssigkeitsmenge verlangsamt eine rasche Konzentrationssteigerung. (3) Schliesslich scheint es möglich zu sein, dass die osmotisch wirksamen Substanzen—wie etwa die freien Aminosäuren—in den *l(3)tr*-Larven schneller freigesetzt werden können als in den  $+/+$ -Larven. In diesem Zusammenhang ist eine frühere Feststellung von RUEGG (1968) von Bedeutung, wonach die Proteasenaktivität im Blut und Fettkörper bei der vorliegenden Mutante rund 8-, bzw. 4-mal höher ist als beim Wildtyp.

Wie bereits erwähnt, haben wir festgestellt, dass die *l(3)tr*-Larven das durch Anstechen verlorene Blut innerhalb von 24 Stunden weitgehend ersetzen können, und dass die osmotische Konzentration der Ersatzhaemolymphe sich nicht von derjenigen der ursprünglichen Haemolymphe unterscheidet. Die gleichen Ergebnisse haben HADORN und STUMM-ZOLLINGER (1953) für die freien ninhydrinpositiven Substanzen und RUEGG (1968) für den Proteingehalt erhalten. Somit wird gezeigt, dass die biochemischen Eigenschaften der Haemolymphe zum genotypischen Schädigungsmuster der vorliegenden Letalmutante gehören.

Ein Vergleich des elektronenmikroskopischen Baus der Analorgane von  $+/+$ - und *l(3)tr*-Larven deckt keine Unterschiede prinzipieller Natur auf. In beiden Genotypen stellen die Analorgane typische Absorptionsorgane dar, die sich durch Aufenthalt in hypo- und hypertonen Lösungen in vergleichbarer Weise verändern. Die wenigen dennoch feststellbaren Unterschiede beruhen hauptsächlich auch der Tatsache, dass die *l(3)tr*-Larven über mehr Haemolymphe und freie Aminosäuren verfügen. Demzufolge muss angenommen werden, dass es in den *l(3)tr*-Larven nicht durch eine primäre Störung des Wasserhaushaltes zu einer sekundären Aminosäuren-Akkumulation und damit der Verhinderung einer drohenden Hypotonie kommt. Vielmehr scheint die osmoregulatorische Funktion in den *l(3)tr*-Larven nicht wesentlich gestört zu sein. In diese Richtung deuten auch die Ergebnisse zahlreicher Autoren, wonach die Proteinsynthese der *l(3)tr*-Larven gehemmt ist (vergl. CHEN, 1971).

**Zusammenfassung**—Das Analorgan der Larven des Wildtyps und der Mutante '*letal-translucida*' (*l(3)tr*,  $3-20 \pm 0,8$ ) von *Drosophila melanogaster* wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Mit Hilfe der Kryoskopie und Mikrotitration wurden die osmotische Gesamtkonzentration und der Chloridgehalt der Haemolymphe bestimmt. Ferner wurden die Einflüsse einer hypotonischen, resp. verschiedener hypertonen Lösungen auf das Analorgan und die Haemolymphkonzentrationen eingehend analysiert; dabei interessierten wir uns insbesondere für die funktionelle Bedeutung und eine eventuelle Störung dieses Organs in der Letalmutante.

Das Analorgan gibt sich durch folgende Charakteristika als typisches Absorptionsorgan zu erkennen: (a) Die Cuticula des Analorgans ist bedeutend dünner als diejenige der übrigen Körperbereiche und zeigt eine durch zahlreiche porenförmige Einstülpungen erreichte Oberflächenvergrösserung. (b) Die einschichtige Epidermis besteht aus grossen, breiten Zellen, deren cuticulanahe, apikale Zellmembran durch zahlreiche schmale und parallel verlaufende Plasmamembran-Faltungen erheblich erweitert ist. (c) Ein Netzwerk

von Mikrotubuli sowie eine Anreicherung von Mitochondrien, Vakuolen und Vesikel deuten auf einen in diesem Organ stattfindenden aktiven Stofftransport hin.

Nach einem einstündigen Aufenthalt in einer stark hypotonischen Lösung (destilliertes Wasser) werden sowohl in den  $+/-$  als auch in den  $l(3)tr$ -Larven die Plasmamembran-Faltungen vermehrt und verlängert. Die Mitochondrien nehmen zahlenmässig zu und werden in die Falten verlagert. Umgekehrt werden in einer hypertonischen Lösung (1,42% bis 11,96% NaCl) die Plasmamembran-Falten verkürzt und reduziert. Die Mitochondrienzahl nimmt ebenfalls ab. Mit zunehmender Salinität und Aufenthaltsdauer treten verschiedene undefinierbare Körper, degenerierte Mitochondrien und Vesikel auf, was auf eine beginnende Autolyse hindeutet.

Die osmotische Konzentration in viertägigen  $+/-$ -Larven beträgt 1,02% NaCl, in physiologisch gleichaltrigen (fünftägigen)  $l(3)tr$ -Larven 0,65% NaCl. Beide Genotypen vermögen die osmotische Konzentration in einer hypotonischen Lösung weitgehend zu regulieren; die obere Grenze der NaCl-Konzentration des Aussenmediums für eine erfolgreiche Regulation liegt bei 5%.

Die Chloridionenkonzentration in viertägigen  $+/-$ -Larven beträgt 0,19% NaCl, in  $l(3)tr$ -Larven des entsprechenden physiologischen Alters 0,14% NaCl. In einer hypotonischen Lösung sind beide Genotypen durchaus fähig, die Chloridionenkonzentration zu regulieren. Die Regulation versagt hingegen in jeder über 1% NaCl steigenden hypertonischen Lösung. Nach einer Blockierung der Analorgane durch Silberimprägnation bricht jegliches Regulationsvermögen zusammen.

Zwischen dem Wildtyp und der  $l(3)tr$ -Mutante konnte kein deutlicher Unterschied sowohl in der Feinstruktur als auch in der Regulationsleistung des Analorgans nachgewiesen werden. Es scheint, dass die Mutationswirkung nicht auf einer primären Störung des Wasserhaushaltes beruht.

*Anerkennung*—Die vorliegende Arbeit wurde teilweise durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. P. S. CHEN, danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas und die wertvolle beratende Mitarbeit. Herrn FRANZ SCHWEGLER bin ich für die Einführung in die Technik der Elektronenmikroskopie zu grossem Dank verpflichtet.

#### LITERATUR

- BEADLE L. C. and SHAW J. (1950) The retention of salt and the regulation of the non-protein nitrogen fraction in the blood of the aquatic larva, *Sialis lutaria*. *J. exp. Biol.* **27**, 96–109.
- BURSELL E. (1970) *An Introduction to Insect Physiology*. Academic Press, London.
- CHEN P. S. (1971) *Biochemical Aspects of Insect Development*. Karger, Basel.
- CLARK S. L. (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 349–362.
- COPELAND E. (1964) A mitochondrial pump in the cells of the anal papillae of mosquito larvae. *J. Cell Biol.* **23**, 253–264.
- CROGHAN P. C. and LOCKWOOD A. P. M. (1960) The composition of the haemolymph of the larva of *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Biol.* **37**, 339–343.
- EICHELBERG D., WESSING A., und POLENZ A. (1972) Struktur und Funktion der larvalen Analorgane von *Drosophila*. *Cytobiol.* **6**, 410–426.
- GLOOR H. und CHEN P. S. (1950) Ueber ein Analorgan bei *Drosophila*-Larven. *Rev. suisse Zool.* **57**, 570–576.
- GUPTA B. L. and BERRIDGE M. J. (1966a) Fine structural organization of the rectum in the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.), with special reference to connective tissue, trachea and neurosecretory innervation in the rectal papillae. *J. Morph.* **120**, 23–82.

- GUPTA B. L. and BERRIDGE M. J. (1966b) A coat of repeating subunits on the cytoplasmatic surface of the plasma membrane in the rectal papillae of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Meig.), studied *in situ* by electron microscopy. *J. Cell Biol.* **29**, 376–382.
- HADORN E. (1961) *Developmental Genetics and Lethal Factors*. Methuen, London.
- HADORN E. und STUMM-ZOLLINGER E. (1953) Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutante 'letal-translucida' (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*. *Rev. suisse Zool.* **60**, 506–516.
- QUINTART A. (1960) L'organe anal de la larve de *Drosophila melanogaster*. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.* **91**, 117–128.
- RAMSAY J. A. (1949) A new method of freezing point determination for small quantities. *J. exp. Biol.* **26**, 57–64.
- REYNOLDS E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208–211.
- ROBINSON J. R. (1960) Metabolism of intracellular water. *Physiol. Rev.* **40**, 12–149.
- RUEGG M. K. (1968) Untersuchungen zum Proteinstoffwechsel des Wildtyps und der Letalmutante (*ltr*) von *Drosophila melanogaster*. *Z. vergl. Physiol.* **60**, 275–307.
- SMITH D. S. (1968) *Insect Cells*. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- SMITH R. I. and WORKSHOP E. (1957) Osmotic pressure by comparative melting point method. Schriftliche Mitteilung der University of British Columbia.
- SOHAL R. S. and COPELAND E. (1966) Ultrastructural variations in the anal papillae of *Aedes aegypti* (L.) at different environmental salinities. *J. Insect Physiol.* **12**, 429–439.
- TSUBO I. and BRANDT P. W. (1962) An electron microscope study of the Malpighian tubules of the grasshopper, *Dissosteira carolina*. *J. Ultrastruct. Res.* **6**, 28–35.
- WADDINGTON C. H. (1959) Canalisation of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature, Lond.* **183**, 1654–1655.
- WHEELER B. M. (1947) The iodine metabolism of *Drosophila gibberosa* studied by means of radioactive  $I^{131}$ . *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.* **33**, 298–302.
- WIGGLESWORTH V. B. (1933a) The effect of salts on the anal gills of mosquito larvae. *J. exp. Biol.* **10**, 1–15.
- WIGGLESWORTH V. B. (1933b) The function of the anal gills of the mosquito larvae. *J. exp. Biol.* **10**, 16–26.
- WIGGLESWORTH V. B. (1937) A simple method of volumetric analysis for small quantities of fluid: estimation of chloride in 0.3  $\mu$ l of tissue fluid. *Biochem. J.* **31**, 1719–1722.
- WIGGLESWORTH V. B. (1938) Regulation of osmotic pressure and chloride concentration in the haemolymph of mosquito larvae. *J. exp. Biol.* **15**, 235–247.
- WIGGLESWORTH V. B. and SALPETER M. M. (1962) Histology of Malpighian tubules in *Rhodnius*. *J. Insect Physiol.* **8**, 299–307.
- YALVAC S. (1963) The analplates of *Drosophila* larvae in different species. *Genetics Today* **1**, 138.
- YALVAC S. (1966) Variation in the larval analorgan in various *Drosophilidae*. *Drosophila Inf. Serv.* **41**, 80–81.
- ZWICKY K. (1954) Osmoregulatorische Reaktionen der Larve von *Drosophila melanogaster*. *Z. vergl. Physiol.* **36**, 367–390.



### Curriculum vitae

Christian Brugger, von Möriken AG und Gossau ZH, wohnhaft in Dürnten ZH.

Am 22. November 1943 wurde ich in Gossau ZH geboren. Ich besuchte dort die Primar- und Sekundarschule. Im Herbst 1963 schloss ich an der Kantonsschule Zürcher Oberland in Wetzikon mit der kantonalen Lehramtsmatur ab. Anschliessend immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich. Im November 1968 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler mit Hauptfach Zoologie. Darauf begann ich mit den Arbeiten zur Dissertation, welche unter der Leitung von Prof. P. S. Chen standen. Während dieser Zeit besuchte ich zudem Vorlesungen über Nationalökonomie an der Universität Zürich und bestand ich das Diplom für das höhere Lehramt.

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen und Kurse der Herren Professoren und Dozenten Batschelet, Bickel, Biegert, Billeter, Burla, Chen, Christen, Eugster, Graber, Hadorn, Hauser, Hediger, Hunsperger, Kuhn-Schnyder, Künzi, Markgraf, Märki, Pfeiffer, Rast, Rohweder, Rutishauser, Schnitter, Schuhmacher, Schwegler, Senti, Stüssi, Tardent, Töndury, Wagner, Wanner, Weissmann, Woodtli, Ziegler und Ziswiler.

Seit 1972 bin ich als Hauptlehrer für Biologie an der Kantonsschule Oerlikon-Zürich tätig.

